

Docket No. 219196US0

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Masahide SATO, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: METHOD OF DIFFERENTIATING BEER YEAST

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

#7
8/28/02
JC868 U.S. PTO
10/067241
02/07/02

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY
Japan

APPLICATION NUMBER
2001-034113

MONTH/DAY/YEAR
February 9, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

C. Irvin McClelland
Registration Number 21,124



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 2月 9日

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-034113

出 願 人
Applicant(s):

サッポロビール株式会社

2001年12月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3113002

【書類名】 特許願

【整理番号】 510-1310

【提出日】 平成13年 2月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当目 1 0 サッポロビール株式会社 醸
 造技術研究所内

 【氏名】 佐藤 雅英

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当目 1 0 サッポロビール株式会社 醸
 造技術研究所内

 【氏名】 土屋 陽一

【特許出願人】

 【識別番号】 000002196

 【氏名又は名称】 サッポロビール株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088155

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】

 【識別番号】 100089978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 塩田 辰也

【選任した代理人】

 【識別番号】 100092657

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【選任した代理人】

【識別番号】 100107191

【弁理士】

【氏名又は名称】 長濱 範明

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014708

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ビール酵母の識別方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ビール酵母の識別方法であって、

酵母 *Lg-FLO1* 遺伝子の N 末端側の一部からなる塩基配列 (A) の下流に酵母第 IX 染色体の一部からなる塩基配列 (B) が連結し、且つ、配列表の配列番号 1 ～ 6 に記載の塩基配列を含む新規遺伝子 (C) において、該塩基配列 (A) と該塩基配列 (B) との連結部分を増幅可能なプライマーを合成する第 1 の工程と、

前記第 1 の工程で合成したプライマー及び被検体となる酵母から分離した DNA を用いて PCR (Polymerase chain reaction) 法を行う第 2 の工程と、

前記第 2 の工程で得られた PCR 増幅産物から該酵母が醸造用下面ビール酵母か野生酵母かを識別する第 3 の工程と、
を含むことを特徴とするビール酵母の識別方法。

【請求項 2】 前記プライマーが、配列表の配列番号 7 及び 8 の塩基配列をそれぞれ含む 1 組のプライマーであることを特徴とする請求項 1 に記載のビール酵母の識別方法。

【請求項 3】 前記プライマーの塩基配列において、1 若しくは複数の塩基が置換、欠失又は挿入された塩基配列を有し、且つ、PCR 用のプライマーとしての機能を有することを特徴とする請求項 2 に記載のビール酵母の識別方法。

【請求項 4】 ビール酵母の識別方法であって、

酵母 *Lg-FLO1* 遺伝子の N 末端側の一部からなる塩基配列 (A) の下流に酵母第 IX 染色体の一部からなる塩基配列 (B) が連結し、且つ、配列表の配列番号 1 ～ 6 に記載の塩基配列を含む新規遺伝子 (C) において、該塩基配列 (A) の一部を増幅可能なプライマーを合成する第 1 の工程と、

前記第 1 の工程で合成したプライマー及び被検体となる酵母から分離した DNA を用いて PCR (Polymerase chain reaction) 法を行う第 2 の工程と、

前記第 2 の工程で得られた P C R 増幅産物から該酵母が醸造用下面ビール酵母か野生酵母かを識別する第 3 の工程と、
を含むことを特徴とするビール酵母の識別方法。

【請求項 5】 前記プライマーが、配列表の配列番号 9 及び 1 0 の塩基配列をそれぞれ含む 1 組のプライマーであることを特徴とする請求項 4 に記載のビール酵母の識別方法。

【請求項 6】 前記プライマーの塩基配列において、1 若しくは複数の塩基が置換、欠失又は挿入された塩基配列を有し、且つ、P C R 用のプライマーとしての機能を有することを特徴とする請求項 5 に記載のビール酵母の識別方法。

【請求項 7】 配列表の配列番号 7 及び 8 に記載の塩基配列をそれぞれ含むことを特徴とするプライマーセット。

【請求項 8】 前記プライマーセットの塩基配列において、1 若しくは複数の塩基が置換、欠失又は挿入された塩基配列を有し、且つ、プライマーとしての機能を有することを特徴とする請求項 7 に記載のプライマーセット。

【請求項 9】 配列表の配列番号 9 及び 1 0 に記載の塩基配列をそれぞれ含むことを特徴とするプライマーセット。

【請求項 1 0】 前記プライマーセットの塩基配列において、1 若しくは複数の塩基が置換、欠失又は挿入された塩基配列を有し、且つ、プライマーとしての機能を有することを特徴とする請求項 9 に記載のプライマーセット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、醸造用下面ビール酵母と野生酵母の識別方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

麦芽アルコール飲料（ビール、発泡酒等）の醸造工程において、醸造に用いられる以外の野生酵母、例えば、ハンセヌラ属(Hansenula)、ブレタノマイセス属(Brettanomyces)、カンジタ属(Candida)、醸造用酵母以外のサッカロミセス属(Saccharomyces)等が混入することにより、麦芽アルコール飲料の香味特性が劣

化し、場合によっては混濁やオフフレーバーを引き起こす原因となる。

【0003】

従って、麦芽アルコール飲料の醸造工程において検出された酵母が醸造用下面ビール酵母であるか否かを迅速に識別することは、酵母の発酵特性や麦芽アルコール飲料の香味特性を維持、管理するために重要である。

【0004】

一方、酵母の同定は、これまで伝統的な生理学的、生化学的、形態学的な手法によって行われてきたが、迅速性、正確さに欠ける場合が多かった。また、醸造用下面ビール酵母は、サッカロミセス属(*Saccharomyces*)に分類されていたこともあり（現在では、サッカロミセス・パストリアヌスと分類される）、醸造用下面ビール酵母以外のサッカロミセス属酵母、例えば、サッカロミセス・セレビスシエ(*S. cerevisiae*)、サッカロミセス・バヤナス(*S. bayanus*)、サッカロミセス・ジアスタティカス(*S. diastaticus*)などを、これまでの伝統的な手法で醸造用下面ビール酵母から識別することは困難であった。

【0005】

前記の問題点を解決すべく、特開平11-56366号公報には、サッカロミセス属のFLO1遺伝子の繰り返し配列部分をPCR法によって検出することで醸造用酵母と非醸造用酵母を識別する方法が記載されている。しかしながら、FLO1遺伝子及びLg-FLO1遺伝子の繰り返し配列は非常に不安定であるとの報告があり(*Yeast*, 10: 211-225, 1994., *J. Bacteriol.* 180(24): 6503-6510, 1998.)、場合によっては、繰り返し配列部分が完全に脱落してしまうことがあった。従って、特開平11-56366号公報に記載の方法では、醸造用下面ビール酵母でも野生酵母と誤って判定される場合があるという問題があった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、醸造用下面ビール酵母と野生酵母を高精度に識別する方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、L g - F L O 1 遺伝子のN末端側の一部からなる塩基配列（A）及び酵母Y I L 1 6 9 c 遺伝子からなる塩基配列（B）を含む酵母の新規遺伝子（C）において、塩基配列（A）と塩基配列（B）の結合部分を増幅可能なプライマーセットを用いることにより、醸造用下面ビール酵母と野生酵母を高精度に識別可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明のビール酵母の識別方法は、ビール酵母の識別方法であって、酵母L g - F L O 1 遺伝子のN末端側の一部からなる塩基配列（A）の下流に酵母第I X染色体の一部からなる塩基配列（B）が連結し、且つ、配列表の配列番号1～6に記載の塩基配列を含む新規遺伝子（C）において、前記塩基配列（A）と前記塩基配列（B）との連結部分を増幅可能なプライマーを合成する第1の工程と、前記第1の工程で合成したプライマー及び被検体となる酵母から分離したDNAを用いてPCR（P o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n）法を行う第2の工程と、前記第2の工程で得られたPCR増幅産物から前記酵母が醸造用下面ビール酵母か野生酵母かを識別する第3の工程と、を含むことを特徴とするビール酵母の識別方法である。

【 0 0 0 9 】

ここで、前記プライマーとして、配列表の配列番号7及び8の塩基配列をそれぞれ含む1組のプライマーを用いることが好ましい。

【 0 0 1 0 】

また、このようなプライマーの塩基配列において、1若しくは複数の塩基が置換、欠失又は挿入された塩基配列を有し、且つ、PCR用のプライマーとしての機能を有するプライマーであることが好ましい。

【 0 0 1 1 】

さらに、本発明のビール酵母の識別方法は、酵母L g - F L O 1 遺伝子のN末端側の一部からなる塩基配列（A）の下流に酵母第I X染色体の一部からなる塩基配列（B）が連結し、且つ、配列表の配列番号1～6に記載の塩基配列を含む新規遺伝子（C）において、前記塩基配列（A）の一部を増幅可能なプライマー

を合成する第 1 の工程と、前記第 1 の工程で合成したプライマー及び被検体となる酵母から分離した DNA を用いて PCR (Polymerase chain reaction) 法を行う第 2 の工程と、前記第 2 の工程で得られた PCR 増幅産物から該酵母が醸造用下面ビール酵母か野生酵母かを識別する第 3 の工程と、を含むことを特徴とするビール酵母の識別方法である。

【 0 0 1 2 】

ここで、前記プライマーが、配列表の配列番号 9 及び 1 0 の塩基配列をそれぞれ含む 1 組のプライマーを用いることが好ましい。

【 0 0 1 3 】

また、前記プライマーの塩基配列において、1 若しくは複数の塩基が置換、欠失又は挿入された塩基配列を有し、且つ、PCR 用のプライマーとしての機能を有するプライマーであることが好ましい。

【 0 0 1 4 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【 0 0 1 5 】

先ず、本発明の第 1 の実施形態について説明する。

【 0 0 1 6 】

本発明の第 1 の実施形態にかかるビール酵母の識別方法は、酵母 L g - F L O 1 遺伝子の N 末端側の一部からなる塩基配列 (A) の下流に酵母第 I X 染色体の一部からなる塩基配列 (B) が連結し、且つ、配列表の配列番号 1 ~ 6 に記載の塩基配列を含む新規遺伝子 (C) において、該塩基配列 (A) と該塩基配列 (B) との連結部分を増幅可能なプライマーを合成する第 1 の工程と、前記第 1 の工程で合成したプライマー及び被検体となる酵母から分離した DNA を用いて PCR (Polymerase chain reaction) 法を行う第 2 の工程と、前記第 2 の工程で得られた PCR 増幅産物から該酵母が醸造用下面ビール酵母か野生酵母かを識別する第 3 の工程と、を含むことを特徴とするビール酵母の識別方法である。

【 0 0 1 7 】

先ず、本発明の第 1 の実施形態にかかる第 1 の工程について説明する。

【 0 0 1 8 】

本発明にかかる第 1 の工程は、酵母 *Lg-FL01* 遺伝子の N 末端側の一部からなる塩基配列 (A) の下流に酵母第 I X 染色体の一部からなる塩基配列 (B) が連結し、且つ、配列表の配列番号 1 ～ 6 に記載の塩基配列を含む新規遺伝子 (C) において、該塩基配列 (A) と該塩基配列 (B) との結合部分を増幅可能なプライマーセットを合成する工程である。

【 0 0 1 9 】

本発明にかかる塩基配列 (A) は、酵母 *Lg-FL01* 遺伝子の N 末端側の一部からなるものである。ここで、酵母 *Lg-FL01* 遺伝子は、酵母に凝集性を付与する機能を有する *Lg-FL01* タンパク質をコードする遺伝子であることが報告されている (特開平 8 - 2 6 6 2 8 7 号公報)。

【 0 0 2 0 】

また、*Lg-FL01* 遺伝子の N 末端部分は、マルトース、グルコース等の糖によって酵母の凝集性が阻害される性質に関与する領域であることが報告されている (J. Bacteriol. 180 (24) : 6503 - 6510, 1998)。

【 0 0 2 1 】

なお、凝集性とは、発酵過程において分散していた酵母が集合して細胞表面で付着・結合して塊 (フロック) を形成する性質をいう。醸造用下面ビール酵母では、発酵液中で細胞が凝集して沈降し液中から速やかに分離しやすい特性を持った株と、凝集しにくく比較的長い期間分散・浮遊する特性を持った株とがあり、前者を「凝集性酵母」、後者を「非凝集性酵母」という。

【 0 0 2 2 】

次に、本発明にかかる塩基配列 (B) について説明する。

【 0 0 2 3 】

本発明にかかる塩基配列 (B) は、酵母第 I X 染色体の一部からなる塩基配列であり、その中には酵母 *YIL169c* 遺伝子の塩基配列が含まれる。酵母 *YIL169c* 遺伝子は、*glucan 1, 4-alpha-glucosida*

s e 遺伝子と塩基配列の相同性が高いが、詳細な機能は未だ不明である。

【 0 0 2 4 】

本発明にかかる新規遺伝子は、前記塩基配列 (A) 及び (B) を含み、且つ、配列表の配列番号 1 ～ 6 に記載の塩基配列を含む。配列表の配列番号 1 ～ 6 に記載の塩基配列は、サッカロミセス・セレビシエの第 I X 染色体の左テロメア側からそれぞれ、2 1 3 4 0 ～ 2 1 8 1 8 b p (配列番号 1)、2 1 7 4 3 ～ 2 2 1 9 0 b p (配列番号 2)、2 2 3 5 3 ～ 2 2 8 6 5 b p (配列番号 3)、2 2 9 2 6 ～ 2 3 3 9 8 b p (配列番号 4)、2 3 9 4 4 ～ 2 4 2 1 9 b p (配列番号 5)、2 4 4 0 8 ～ 2 4 9 9 7 b p (配列番号 6) に該当する。なお、前記の各配列をデータベース上のサッカロミセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) の第 I X 染色体の塩基配列と比較した場合に、これらの塩基配列間には 1 ～ 1 0 数塩基の相違が見られるが、この相違は酵母株間の遺伝子多型によるものか、又は、塩基配列を決定する際のエラーと考えられ、実質的には同一の遺伝子である。従って、本発明にかかる新規遺伝子 (C) は、配列表の配列番号 1 ～ 6 に記載の塩基配列そのものを含むもののみならず、実質的に同一の遺伝子と見なすことができる範囲で配列表の塩基配列 1 ～ 6 の塩基配列と異なっている塩基配列を有するものであってもよい。具体的には、前記塩基配列 1 ～ 6 に含まれる塩基配列において、各塩基配列中 1 ～ 2 0 塩基が異なっても、実質的には塩基配列 1 ～ 6 を含む遺伝子と同一であるものと見なすことができる。

【 0 0 2 5 】

従って、本発明にかかる新規遺伝子は、図 5 に示すように全長 9. 4 k b p で、L g - F L O 1 遺伝子の一部からなる塩基配列 (A) の下流にサッカロミセス・セレビシエの第 I X 染色体の一部からなる塩基配列が連結した構造を有する遺伝子である。本発明にかかる醸造用下面ビール酵母においては、この菌種が樹立される際にゲノム DNA の組換えが起こり、その結果 L g - F L O 1 遺伝子の一部と第 I X 染色体の一部が結合し、新規遺伝子 (C) のような塩基配列を有する遺伝子が生じるに至ったものと本発明者らは考えている。

【 0 0 2 6 】

また、前記新規遺伝子における「該塩基配列 (A) と該塩基配列 (B) との連

結部分」とは、前述したように、前記新規遺伝子は L g - F L O 1 遺伝子の一部からなる塩基配列 (A) の下流にサッカロミセス・セレビシエの第 I X 染色体の一部からなる塩基配列 (B) が連結した構造を有することから、その結果生じた前記塩基配列 (A) と前記塩基配列 (B) の連結部分を指すものである。しかしながら、本発明にかかる新規遺伝子はその塩基配列の全てが明らかになってはいないことから、結合部位の塩基配列は不明である。

【 0 0 2 7 】

本発明にかかるプライマーセットは、このような結合部位を P C R 法によって増幅可能な位置に設定されている。すなわち、プライマーセット中の一方向のプライマーは前記新規遺伝子 (C) を構成する塩基配列 (A) 上にセンス方向に設定されており、他方のプライマーは前記新規遺伝子を構成する塩基配列 (B) 上にアンチセンス方向に設定されている。

【 0 0 2 8 】

このようなプライマーとしては、その塩基数は特に制限されないが、10～50 b p であることが好ましく、15～30 b p であることがより好ましい。また、その配列としては特に制限はないが、L g - F L O 1 遺伝子上のセンス方向のプライマーが 5' -GGAATACTGCCTCTTGAGT-3' (配列番号 7) であり、第 I X 染色体上のアンチセンス方向のプライマーが 5' -GGATTCTTCAGCGTTGAAGT-3' (配列番号 8) であることが好ましい。

【 0 0 2 9 】

また、本発明にかかるプライマーセットは、配列番号 7 及び 8 のプライマーの塩基配列を含む塩基配列を有するプライマーからなるプライマーセットであることが好ましい。具体的には、例えば、前記プライマーには、増幅産物をクローニングする場合を考慮して制限酵素認識配列が付与されていてもよい。

【 0 0 3 0 】

さらに、前記プライマーが P C R 用のプライマーとしての機能を有する限りは、1 又は 2 以上の置換、欠失又は挿入があるプライマーからなるプライマーセットであってもよい。ここで、「P C R 用のプライマーとして機能する」とは、前記新規遺伝子 (C) を鋳型として P C R を行った際にプライマーとして機能する

ことが可能であることを示す。すなわち、通常のPCR法の条件下で前記プライマーが前記新規遺伝子にアニーリング可能である限りはその塩基配列としては特に制限はない。

【0031】

本発明にかかる第1の工程では、前述のようなプライマーをDNA合成機等で合成すればよい。

【0032】

次に、本発明の第1の実施形態にかかる第2の工程について説明する。

【0033】

本発明にかかる第2の工程は、前記第1の工程で合成したプライマーセット及び被検体となる酵母から分離したDNAを用いてPCR (Polymerase chain reaction) 法を行う工程である。

【0034】

被検体となる酵母からDNAを抽出する方法としては特に制限はなく、公知の方法を用いて抽出を行えばよい。具体的には、例えば、培養した酵母を遠心分離により集菌し、Holmらの方法 (Gene, 42:169-173, 1986) に従って酵母からDNAを抽出することができる。

【0035】

本発明にかかる第2の工程では、抽出したDNAを鋳型とし、第1の工程で合成したプライマーを用いてPCR法を行う。前記PCR法は公知の方法を用いて行えばよいが、例えば、FEMS Microbiol. Lett., Vol.108, p259-264 (1993)に記載の方法を用いることができる。また、PCR法の条件は、用いるプライマーの T_m (melting temperature) に応じて適宜設定すればよいが、例えば、変性温度が90～98℃、アニーリング温度が40～75℃、伸長温度が65～75℃、サイクル数は10回以上であることが好ましい。また、前記変性温度に維持する時間は10秒～2分、アニーリング温度に維持する時間は20秒～2分、伸長温度に維持する時間は1分～20分であることが好ましい。

【0036】

次に、本発明の第 1 の実施形態にかかる第 3 の工程について説明する。

【 0 0 3 7 】

本発明にかかる第 3 の工程は、前記第 2 の工程で得られた P C R 増幅産物から前記酵母が醸造用下面ビール酵母か野生酵母かを識別する工程である。

【 0 0 3 8 】

第 2 の工程で得られた P C R 産物から前記酵母が醸造用下面ビール酵母から野生酵母かを識別する方法としては特に制限はないが、例えば、P C R 増幅産物の一部をアガロースゲル電気泳動に供し、検出される増幅断片の有無によって醸造用下面ビール酵母か否かを判定することができる。具体的には、例えば、前記の配列番号 7 及び 8 の核酸配列を有するプライマーセットを用いて P C R 法を行った場合には、被検体となった酵母が醸造用下面ビール酵母である場合には増幅されたバンドが検出されるが、酵母が野生酵母である場合にはバンドは検出されない。

【 0 0 3 9 】

このように、本発明の第 1 の実施形態にかかる方法によれば、醸造用下面ビール酵母の株の相違、又は、醸造用下面ビール酵母の凝集性の強弱にかかわらず下面ビール酵母を検出することが可能となる。

【 0 0 4 0 】

次に、本発明にかかる第 2 の実施形態について説明する。

【 0 0 4 1 】

本発明の第 2 の実施形態にかかるビール酵母の識別方法は、酵母 L g - F L O 1 遺伝子の N 末端側の一部からなる塩基配列 (A) の下流に酵母第 I X 染色体の一部からなる塩基配列 (B) が連結し、且つ、配列表の配列番号 1 ～ 6 に記載の塩基配列を含む新規遺伝子 (C) において、該塩基配列 (A) の一部を増幅可能なプライマーを合成する第 1 の工程と、前記第 1 の工程で合成したプライマー及び被検体となる酵母から分離した DNA を用いて P C R (P o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n) 法を行う第 2 の工程と、前記第 2 の工程で得られた P C R 増幅産物から該酵母が醸造用下面ビール酵母か野生酵母かを識別する第 3 の工程と、を含むことを特徴とするビール酵母の識別方法である。

【 0 0 4 2 】

先ず、本発明の第 2 の実施形態にかかる第 1 の工程について説明する。

【 0 0 4 3 】

前記第 1 の工程は、酵母 *Lg-FL01* 遺伝子の N 末端側の一部からなる塩基配列 (A) の下流に酵母第 I X 染色体の一部からなる塩基配列 (B) が連結し、且つ、配列表の配列番号 1 ～ 6 に記載の塩基配列を含む新規遺伝子 (C) において、該塩基配列 (A) の一部を増幅可能なプライマーセットを合成する工程である。

【 0 0 4 4 】

前記新規遺伝子 (C) は、前述した本発明に第 1 の実施形態にかかる新規遺伝子 (C) と同一の遺伝子である。

【 0 0 4 5 】

本工程においては、前記新規遺伝子において、塩基配列 (A) の一部を増幅可能なプライマーセットを合成する。ここで、「前記塩基配列 (A) の一部」とは、その塩基数については特に制限ないが、50 ～ 20000 bp であることが好ましく、100 ～ 10000 bp であることがより好ましい。

【 0 0 4 6 】

また、このようなプライマーとしては、その塩基数は特に制限されないが、10 ～ 50 bp であることが好ましく、15 ～ 30 bp であることがより好ましい。また、その配列としては特に制限はないが、センス方向のプライマーが 5'-AACGTAGCATCAGGAAGTACACAAGCATGC-3' (配列番号 9) であり、アンチセンス方向のプライマーが 5'-GATCGGGTAATAGTAACCGGCGTACATGTA-3' (配列番号 10) であることが好ましい。

【 0 0 4 7 】

また、本発明にかかるプライマーセットは、配列番号 9 及び 10 のプライマーの塩基配列を含む塩基配列を有するプライマーからなるプライマーセットであることが好ましい。具体的には、例えば、前記プライマーには、増幅産物をクローニングする場合を考慮して制限酵素認識配列が付与されていてもよい。

【 0 0 4 8 】

さらに、前記プライマーがPCR用のプライマーとしての機能を有する限りは、1又は2以上の置換、欠失又は挿入があるプライマーからなるプライマーセットであってもよい。ここで、「PCR用のプライマーとして機能する」とは、前記新規遺伝子(C)を鋳型としてPCRを行った際にプライマーとして機能することが可能であることを示す。すなわち、通常のPCR法の条件下で前記プライマーが前記新規遺伝子にアニーリング可能である限りはその塩基配列としては特に制限はない。

【0049】

本発明にかかる第1の工程では、前述のようなプライマーをDNA合成機等で合成すればよい。

【0050】

本発明の第2の実施形態にかかる第2の工程は、前記第1の工程で合成したプライマー及び被検体となる酵母から分離したDNAを用いてPCR(Polymerase chain reaction)法を行う工程である。

【0051】

被検体となる酵母からDNAを抽出する方法としては特に制限はなく、公知の方法を用いて抽出を行えばよい。具体的には、例えば、培養した酵母を遠心分離により集菌し、Holmらの方法(Gene, 42:169-173, 1986)に従って酵母からDNAを抽出することができる。

【0052】

本発明にかかる第2の工程では、抽出したDNAを鋳型とし、第1の工程で合成したプライマーを用いてPCR法を行う。前記PCR法は公知の方法を用いて行えばよいが、例えば、FEMS Microbiol. Lett., Vol.108, p259-264 (1993)に記載の方法を用いることができる。また、PCR法の条件としては、用いるプライマーの T_m に応じて適宜設定すればよいが、例えば、変性温度が90～98℃、アニーリング温度が40～75℃、伸長温度が65～75℃、サイクル数は10回以上、であることが好ましい。また、前記変性温度に維持する時間は10秒～2分、アニーリング温度に維持する時間は20秒～2分、伸長温度に維持する時間は1分～20分であることが好ましい。

【 0 0 5 3 】

次に、本発明の第 2 の実施形態にかかる第 3 の工程について説明する。

【 0 0 5 4 】

本発明にかかる第 3 の工程は、前記第 2 の工程で得られた P C R 増幅産物から前記酵母が醸造用下面ビール酵母か野生酵母かを識別する工程である。

【 0 0 5 5 】

第 2 の工程で得られた P C R 産物から前記酵母が醸造用下面ビール酵母から野生酵母かを識別する方法としては特に制限はないが、例えば、P C R 増幅産物の一部をアガロースゲル電気泳動に供し、検出される増幅断片の有無によって醸造用下面ビール酵母か否かを判定することができる。具体的には、例えば、前記の配列番号 9 及び 1 0 の核酸配列を有するプライマーセットを用いて P C R 法を行った場合には、被検体となった酵母が醸造用下面ビール酵母である場合には増幅されたバンドが検出されるが、酵母が野生酵母である場合にはバンドは検出されない。

【 0 0 5 6 】

このように、本発明の第 2 の実施形態にかかる方法によれば、醸造用下面ビール酵母の株の相違、又は、醸造用下面ビール酵母の凝集性の強弱にかかわらず下面ビール酵母を検出することが可能となる。

【 0 0 5 7 】

【実施例】

以下、実施例及び比較例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【 0 0 5 8 】

比較例 1

(L g - F L O 1 遺伝子による醸造用下面ビール酵母の識別)

醸造用下面ビール酵母と野生酵母を識別するため以下の実験を行った。

全 DNA の抽出は、それぞれ 1 0 m l の Y E P D 培地 (1 % 酵母エキス、2 % バクトペプトン、2 % グルコース) を用いて、2 0 ℃ で、醸造用下面ビール酵母 1 0 株と野生酵母 6 株を定常期まで培養した後、遠心分離により集菌し、H o 1 m ら

の方法 (Gene, 42:169-173, 1986) によって実施した。

【0059】

PCR法は以下のようにして行った。すなわち、小林ら (J. Bacteriol. 180(24)6503-6510, 1998) が報告した Lg-FLO 1 遺伝子の塩基配列を基に 5'-GGAATACTGCCTCTTGGAGT-3' (配列番号 11) と 5'-TACCATACGATTGCCAGCA-3' (配列番号 12) の 2 種のプライマーを合成した。これらのプライマーセットを用い、表 1 に示した酵母の全 DNA を鋳型として PCR を行った。なお、表 1 中の番号 1~16 は図 1 中のレーン番号に該当する。

【0060】

【表 1】

菌株名(下面ビール酵母)	凝集性評価	菌株名(野生酵母)
1: NCYC965	F0	11: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2: NCYC1324	F0	(ATCC 46967)
3: W204	F0	12: <i>Saccharomyces diastaticus</i>
4: W71	F1	13: <i>Pichia</i> (IFO 0035)
5: AJL3126	F1	14: <i>Saccharomyces bayanus</i>
6: NCYC512	F2	(IFO 0676)
7: NCYC719	F2	15: <i>Candida albicans</i>
8: NCYC1250	F2	(ATCC 10259)
9: VLB202	F2	16: <i>Saccharomyces uvarum</i>
10: VLB He Bru	F2	(ATCC 44968)

【0061】

PCRの条件は、94℃ 1分間の後、98℃ 20秒間、68℃ 3分間を30サイクル繰り返した。なお、PCR反応系に加える鋳型DNAの量は、試験の再現性を考慮し、全て0.5~1μgとした。次に、この反応生成物の一部を1%アガロース中で電気泳動し、増幅の有無、又はバンドサイズによって、醸造用下面ビール酵母か否かを判定した。

【0062】

なお、各下面ビール酵母の凝集性の強さは、以下の方法で評価した。発酵終了後に遠心分離して集菌した酵母0.6gを20mlの水道水に懸濁した。酵母懸濁液9mlに対して1mlの1500ppmのカルシウムイオンを含む0.5M酢酸緩衝液(pH4.5)を加えて、手で上下に振り、凝集の程度を目視で3段

階に判定した。すなわち、F 0 : 非凝集性、F 1 : 弱い凝集性、F 2 : 並の凝集性、F 3 : 強い凝集性とした。

【0063】

図1に示したように、この方法では、一部の下面ビール酵母、つまり凝集性が弱化又は消失した株（F 1 又はF 0）を検出することができず、これらの株が下面ビール酵母であることを識別することはできなかった。

【0064】

実施例 1

（L g - F L O 1 遺伝子のN末端側の一部を含む新規融合遺伝子の取得及び塩基配列の部分決定）

醸造用下面ビール酵母の凝集性株及び非凝集性株にかかる凝集性遺伝子のノーザン解析及びサザン解析を実施した。全RNAの抽出及び電気泳動は、凝集性及び非凝集性の下面ビール酵母を比較例1と同様に培養後、Schmittら（Nucleic Acids Research、18（10）：3091、1990）の方法に従って実施した。電気泳動後のゲル中のRNAは、Hybond-N+（アマシャムファルマシアバイオテック社製）を用いて、添付のプロトコールに従いブロッティングした。

【0065】

また、サザン解析では、比較例1と同様に抽出した全DNAを制限酵母HindIII（宝酒造社製）で消化後、1%アガロースゲルで電気泳動し、Hybond-N+（アマシャムファルマシアバイオテック社製）にブロッティングした。RNA又はDNAの検出は、DIGシステム（ロッシュ社製）を用いて行った。

【0066】

また、プローブとして用いたL g - F L O 1 とF L O 1 の部分的DNA断片は、以下のように調製した。すなわち、小林ら（J. Bacteriol. 180（24）：6503-6510、1998）の報告したL g - F L O 1 のN末端部分の塩基配列を基に、5'-AACGTAGCATCAGGAAGTACACAAGCATGC-3'（配列番号9）と5'-GATCGGGTAATAGTAACCGCGGTACATGTA-3'（配列番号10）の2種のプライマーを合成した。これらのプライマーを用いて、凝集性の下面ビール酵母の全DN

Aを鋳型としてPCRを行った。一方、渡ら（Yeast、10:211-225, 1994）が報告したFLO1のC末端部分の塩基配列を基に、5'-TTCCAAC CAGTAGTTCCACC-3'（配列番号13）と5'-GGTCGCGGAAGCCGTCTGTG-3'（配列番号14）の2種のプライマーを合成した。これらのプライマーを用いて同様にPCRを行った。なお、PCRの条件は比較例1と同様である。

【0067】

得られたDNA断片をDIGシステム（ロッシュ社製）のプロトコールに従って標識後、ノーザン解析及びサザン解析を行った。

【0068】

ノーザン解析の結果、図2に示したように、Lg-FLO1のN末端部分をプローブとした場合に、凝集性株と非凝集性株において、Lg-FLO1遺伝子よりも若干低分子側にもシグナルが検出された。本遺伝子をLg-FLO1類似遺伝子とした。一方、FLO1のC末端部分をプローブとした場合には、Lg-FLO1遺伝子のみが検出された。また、サザン解析の結果、図3に示したように、凝集性株と非凝集性株において、Lg-FLO1のN末端をプローブとして用いた場合、Lg-FLO1を含む断片よりもやや高分子側にもシグナルが検出された。このシグナルは、FLO1のC末端部分をプローブとしたサザン解析では、検出されなかったことより、類似遺伝子を含む断片であることが推察された。

【0069】

ここまでの結果から、本類似遺伝子のORF（open reading frame）は、分子量では、Lg-FLO1よりも若干小さく、またLg-FLO1のN末端と共通の配列を有するが、C末部分は、Lg-FLO1と異なることが推察された。また、ここではデータは示さないが、N末端部分の上流に存在するプロモーター領域よりもさらに上流においても類似遺伝子は、Lg-FLO1と共通の部位があることがサザン解析によって確認された。

【0070】

そこで、Lg-FLO1のプロモーター領域よりさらに上流の配列をプライマーとしたinverse-PCRを行うことによって類似遺伝子の全長を取得し

た。inverse-PCRの概要を図4に示す。

【0071】

小林ら（特開平9-224676号公報）の報告したLg-FLO1のプロモーター領域の塩基配列より、5'-ACTAGAATTTAGGCACTTTCAACCCAGCCC-3'（配列番号15）と5'-GCTGCAACCGGAAGTTATTCCTTCTCCACT-3'（配列番号16）の2種のプライマーを合成した。表2に示した非凝集性下面ビール酵母の全DNA20μgを300ユニットのHindIII（宝酒造社製）で消化し、エタノール沈殿によって回収後、30μLのTE緩衝液に溶解し、30μLのスケールでDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いてDNA断片の自己閉環化を行った。なお、表2中の番号1～16は図8中のレーン番号に該当する。

【0072】

【表2】

菌株名(下面ビール酵母)	凝集性評価	菌株名(野生酵母)
1: NCYC965	F0	11: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2: NCYC1324	F0	(ATCC 46967)
3: W204	F0	12: <i>Saccharomyces diastaticus</i>
4: W71	F1	13: <i>Pichia</i> (IFO 0035)
5: AJL3126	F1	14: <i>Saccharomyces bayanus</i>
6: NCYC512	F2	(IFO 0676)
7: NCYC719	F2	15: <i>Candida albicans</i>
8: NCYC1250	F2	(ATCC 10259)
9: VLB202	F2	16: <i>Saccharomyces uvarum</i>
10: VLB He Bru	F2	(ATCC 44968)

【0073】

その結果、図4に示したようなHindIIIで消化された部位が連結した環状分子が形成されることが期待される。この反応生成物をエタノール沈殿で回収し、その10μg相当を鋳型として、上記のプライマーで、LA-PCRキット（宝酒造社製）を用いて、inverse-PCRを行った。PCRの条件は、94℃ 1分間の後、98℃ 20秒間、68℃ 10分間 を30サイクル繰り返した。得られたPCR産物を1%アガロースゲルを用いて電気泳動した結果、図5に示したような約9.4kbの増幅断片が観察された。なお、凝集性株からのLg-FLO1遺伝子を含むHindIII切断断片のPCR法は、小林ら（特

開平 8-266287 号公報) の方法を用いて行った。

【0074】

次に、増幅された約 9.4 kb の断片の制限酵素地図を作成した。作成した制限酵素地図を図 6 に示す。KpnI と HindIII で切断される 2.9 kb 及び 0.6 kb の断片を Perfectly Blunt Cloning Kits (Novagen 社製) を用いてクローン化し、塩基配列の決定に用いた。また、キロシーケンス用ディレーションキット (宝酒造社製) を用い、添付プロトコールに従って、ディレーションミュータントを作製した。塩基配列の決定は、dRhodamine Terminator Cycle Sequence FS Ready Reaction キット (アプライドバイオシステムズ社製) を用い、DNA シーケンサ (アプライドバイオシステムズ社製) によって行った。全部で 6 個所の部分的な塩基配列の決定を行ったところ、全ての配列が、サッカロミセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) の第 IX 染色体の左テロメア側から 21340 bp より下流の配列の配列、すなわち 21340~21818 bp (配列番号 1)、21743~22190 bp (配列番号 2)、22353~22865 bp (配列番号 3)、22926~23398 bp (配列番号 4)、23944~24219 bp (配列番号 5)、24408~24997 bp (配列番号 6) と大部分で一致した。なお、前記の各配列をデータベース上のサッカロミセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) の第 IX 染色体の塩基配列と比較した場合に、これらの塩基配列間には 1~10 数塩基の相違が見られるが、この相違は酵母株間の遺伝子多型によるものか、塩基配列を決定する際のエラーと考えられ、実質的には同一の遺伝子である。

【0075】

この結果より Lg-FL01 類似遺伝子は、Lg-FL01 遺伝子とサッカロミセス・セレビシエの第 IX 染色体の一部との融合遺伝子であることが判明した。また、第 IX 染色体の該当部分には、YIL169c と称される遺伝子 (glucanase, 4- α -glucosidase に類似の遺伝子、機能不明) が存在しており、類似遺伝子の C 末端側には、図 7 で示したように YIL169c 遺伝子の大部分が含まれることが推察された。

【 0 0 7 6 】

実施例 2

(L g - F L O 1 類似遺伝子を利用した醸造用下面ビール酵母の識別)

実施例 1 で得られた L g - F L O 1 類似遺伝子の一部を P C R 法によって増幅させることによって醸造用下面ビール酵母と野生酵母の識別を行った。P C R 法に用いたプライマーとしては、L g - F L O 1 遺伝子の N 末端部分と類似遺伝子に含まれる Y I L 1 6 9 c 遺伝子の一部の配列を利用した。すなわち、5' -GGAAT ACTGCCTCTTGGAGT-3' (配列番号 7) と 5' -GGATTCTTCAGCGTTGAAGT-3' (配列番号 8) の 2 種のプライマーを合成した。これらのプライマーを用い、比較例 1 と同様に酵母の全 D N A を鋳型として P C R を行った。図 8 に示したように、この方法では、凝集性を失った下面ビール酵母でも野生酵母と識別することが可能であった。

【 0 0 7 7 】

実施例 3

L g - F L O 1 と前記類似遺伝子の共通部分の塩基配列を用いて、醸造用下面ビール酵母の野生酵母との識別を行った。識別の対象となる酵母を表 3 に示す。なお、表 3 中の番号 1 ~ 1 6 は図 9 中のレーン番号に該当する。

【 0 0 7 8 】

【表 3】

菌株名(下面ビール酵母)	凝集性評価	菌株名(野生酵母)
1: NCYC965	F0	11: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2: NCYC1324	F0	(ATCC 46967)
3: W204	F0	12: <i>Saccharomyces diastaticus</i>
4: W71	F1	13: <i>Pichia</i> (IFO 0035)
5: AJL3126	F1	14: <i>Saccharomyces bayanus</i>
6: NCYC512	F2	(IFO 0676)
7: NCYC719	F2	15: <i>Candida albicans</i>
8: NCYC1250	F2	(ATCC 10259)
9: VLB202	F2	16: <i>Saccharomyces uvarum</i>
10: VLB He Bru	F2	(ATCC 44968)

【 0 0 7 9 】

P C R 法に用いたプライマーとして、5' -AACGTAGCATCAGGAAGTACACAAGCATGC-3'

(配列番号 9) と 5' -GATCGGGTAATAGTAACCGGCGTACATGTA-3' (配列番号 10) を合成した。これらのプライマーセットを用い、比較例 1 と同様に酵母の全 DNA を鋳型として PCR を行った。図 9 に示したように、この場合も凝集性の強弱にかかわらず、全ての下面ビール酵母の野生酵母との識別が可能であった。

【0080】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の醸造用下面ビール酵母と野生酵母の識別方法によれば、醸造用下面ビール酵母と野生酵母を高精度に識別する方法を提供することが可能となる。

【0081】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SAPPORO BREWERIES LTD.

<120> Method of differentiation for beer yeast

<130> 510-1310

<140>

<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 479

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

agcttcaata aatgcgtgac tggctatagt tgtcggatgg caatccatta ttatgtatac 60
 cgtattatta agagtgaac taggcccgcac tataaatcta acactcagat ccttgtactg 120
 taatgcatat ttatTTTTTtTc acaagttgca tgctaataat accatgatat tttttttgaa 180
 gccttgaaaa atagttcaag cagctacgat atcatgaatc aatatactca ttgcagccta 240
 tgtaatatat ataggttccg tgttaccact cgtttctgat attttcgata tggctacact 300
 gggtttttca tgatggaaat gtgatactac cagttccaat atatttatct tccttatcta 360
 tatgacacgc tgttatttta gttcaagtca gtgtccaatt gaagtgagtg tcacgtgcac 420
 agcgacggta gtcgttggat gtgctaaatg atgttctact gccaatgact gcaaatacg 479

<210> 2

<211> 448

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

gtgagtgtca cgtgcacagc gacggtagtc gttggatgtg ctaaatagatg ttctactgcc 60
 aatgactgca aatacgttcg aagagtataa aatcgaagga aacgaattaa gttgccaatc 120
 cttactgtaa ctatagcatg ttacatatat gtaccataag tatcacatta aggtttcgcc 180
 atagccatgt gcctatatta aatagaaata tcacatggcg atccacggaa tgtttataga 240
 ttttcttctt ttgtctatgg cccgggcgag acattaattt atcttgctga aaaattcgaa 300
 agttaaaact caattatgcg tgggatttct caattaggtt accagaattt caatctgctg 360
 aagaattatg tcttaaaaaa aaaaagtccc gcctcaaaaa agccaaaaag ggtgtgactg 420
 tagattgtgg gtaacttgct gtcaaatg 448

<210> 3

<211> 513

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

```

tgtcggtaag atcttccgta gtggcaggtc aagcagtgag gaagaaagat cggcagtaaa 60
ctgataagag ccaaaccgaa aagtttctta tacgcaaaaa cgctttgaaa attctccaag 120
aatcctatctt gaaactctta ttaataaata aagtataaat ataataaagt ttattgtgag 180
acatgtcgcg ataagcacc cttgtctttc ttggaaggga gaaatttgta atataaagcc 240
aagtgtcag aactcgattt ttttctgacc aaagagcgga agctccacta taaaagttgg 300
gaggtacttt taggttctct taagttcgca ttttaattat gcctgaacga ttttactgtg 360
gacaataagt gaaataagtg tccttaaaat gtgtacgatg tgtacacatc aacctactct 420
ccccttcatt ggcagaagag ggaaccattt catccaaaaa aaataaaaaa ataaaaaaaa 480
tccaaatatt aagctaaaaa aatacttaac tgt                                     513

```

<210> 4

<211> 473

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

```

tttaattcct cagttaaaaa aattagttta agaaagcaag aacgaaaata ccgaccaatg 60
cattcaaagt attggcattc aaacctgcgg caataccctc ggactggaca atgataccag 120
tagaggtctt tattggagct gcagatttgg agtatgtggg aaattgcact agaagccttg 180
gaaatggcag tagtcaatga ggttgcttta gaaccctcag aagtgcacgt agtgtatgac 240
tttgagaag cactagttgc gtgacggttg aagtagcttc aggtatttta gaggtgatta 300
tcttgacgtt acaaccattg tcatcaccat tgagtaacca gtggcagtag tgtatgtcct 360

```

taggggcagc actggtttct gaagtttctg aagtttcttt aggagcttca gaagtgcacag 420
tcttggtgct acatccattg tcatcgact gagtaacagt agcggtagtg tat 473

<210> 5

<211> 276

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5

aacggtttca gttacaacag caccggttga tgtactaacg tgacatccag tttcatcaca 60
agaagtaata gtggcggttag tggatgagca tggaacggtt gtggtaatgg tatagacgtt 120
accattggag tcagttgtct ctgaacaaga aactacgact gtgcttgtgg catttacata 180
gtctagtgtt gtagtgtaaa cagatgttga accggtaacg gaagcaccaa atgaagtgga 240
agcagttgaa ccggtaacgg aagcaccgaa tgaagt 276

<210> 6

<211> 590

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 6

caatagcaaa agagaattgt ctgttacctt gggttgcagt tagaacaccg gtagtaccgt 60
cataagaaag agcagtgatg tcagcggtaa tggcaatttg gttcttacca gtgtagccaa 120
caacaggaat aggagtggca ttggtttcgg ttgggtcaac agcaaggaca cttcaccct 180
tgaatacaac agtttggcca gtaaattgtgt cagggtagt taagtatagg ttaccggaaa 240
tgatgttgac tgtacctttt ccagaaactg gttcgacaat aacataggta cttccattgt 300
ctaggttaat ttcaccgttg ttactgaac cttcagtgtc gtctctacgt tgtagaccgg 360

aaacagaacc accgttgaga atagcgttcg agaaagagaa ggcaccagaa ttggagtatg 420
 gagagaaagt gacttcaccc ttcttggact ttgatagact taaggaaatg tcaccactgt 480
 tgtcaaaaga acttggagtg aaggagtaga tggatgcaga ggtggcagcg gattcttcag 540
 cgttgaagtt accggtcacg tcaaagtttt caccggagat gtcgaattcg 590

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic poly
 nucleotide

<400> 7

ggaataactgc ctcttggagt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic poly
 nucleotide

<400> 8

ggattcttca gcgttgaagt

20

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic poly
nucleotide

<400> 9

aacgtagcat caggaagtac acaagcatgc

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic poly
nucleotide

<400> 10

gatcgggtaa tagtaaccgg cgtacatgta

30

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic poly
nucleotide

<400> 11

ggaatactgc ctcttgagat

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic poly
nucleotide

<400> 12

ttaccatacg attgccagca

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic poly
nucleotide

<400> 13

ttccaaccag tagttccacc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic poly
nucleotide

<400> 14

ggtcgcggaa gccgtctgtg

20

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic poly
nucleotide

<400> 15

actagaattt aggcactttc aaccagccc

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic poly
nucleotide

<400> 16

gctgcaaccg gaagttattc cttctccact

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

配列番号 1 0 及び 1 1 の塩基配列を有するプライマーを用いて醸造用下面ビール酵母と野生酵母を識別した場合の電気泳動写真である。

【図 2】

L g - F L O 1 類似遺伝子のノーザン解析結果を示すオートラジオグラムである。

【図 3】

L g - F L O 1 類似遺伝子のサザン解析結果を示すオートラジオグラムである。

【図 4】

Inverse PCRの概要を示す模式図である。

【図5】

Inverse PCRによって得られたLg-FLO1類似遺伝子の電気泳動写真である。

【図6】

Lg-FLO1類似遺伝子の制限酵素地図を示す模式図である。

【図7】

Lg-FLO1類似遺伝子上に存在するYIL169c遺伝子の位置を示す模式図である。

【図8】

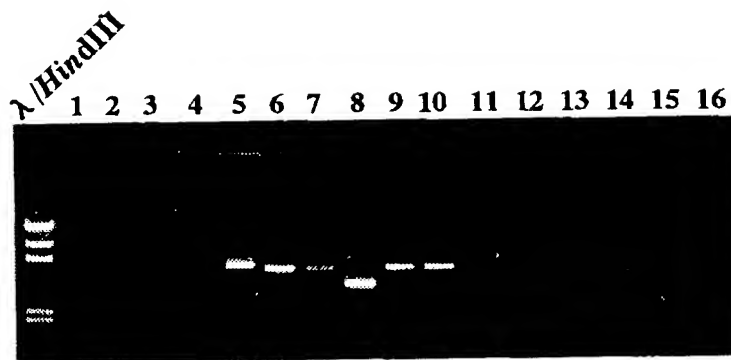
配列番号6及び7に記載の塩基配列を有するプライマーを用いて醸造用下面ビール酵母と野生酵母を識別した場合の電気泳動写真である。

【図9】

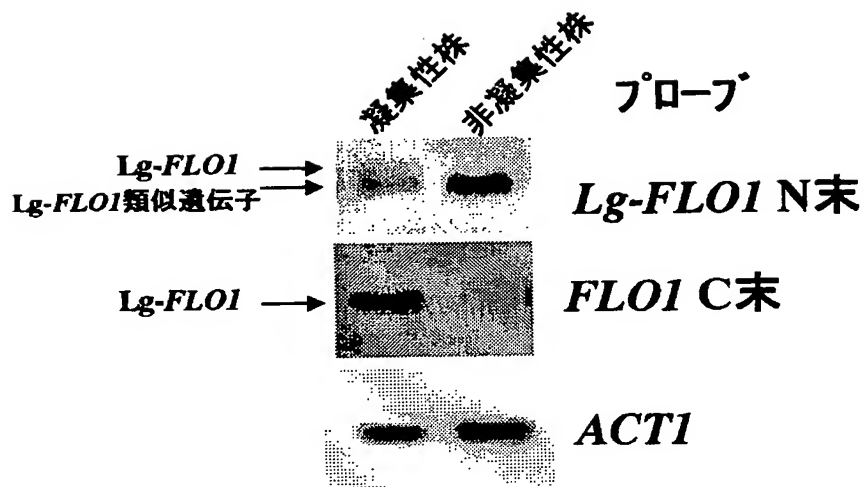
配列番号8及び9に記載の塩基配列を有するプライマーを用いて醸造用下面ビール酵母と野生酵母を識別した場合の電気泳動写真である。

【書類名】 図面

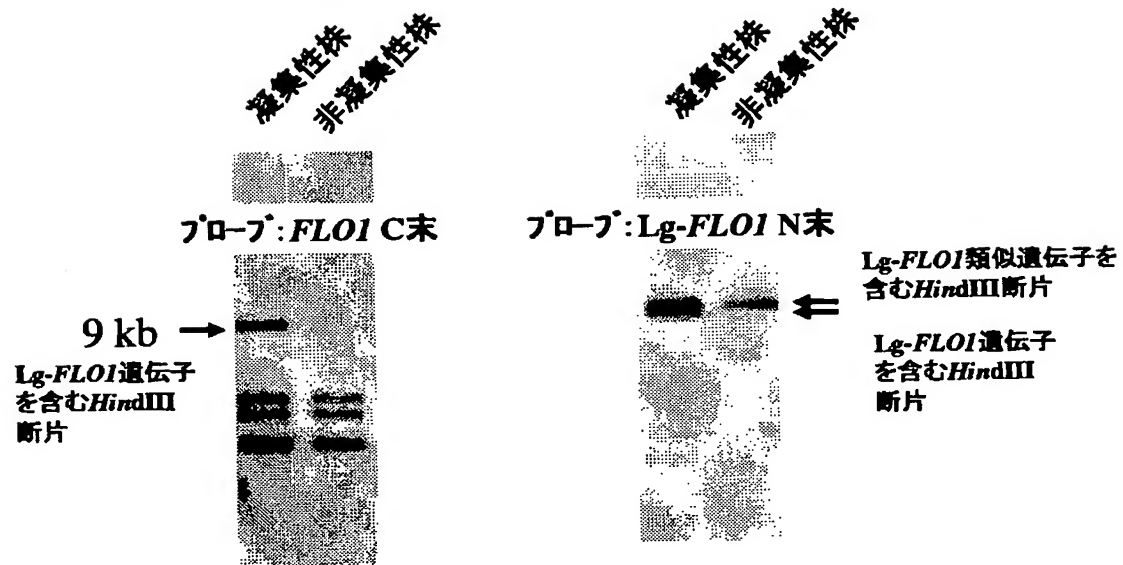
【図 1】



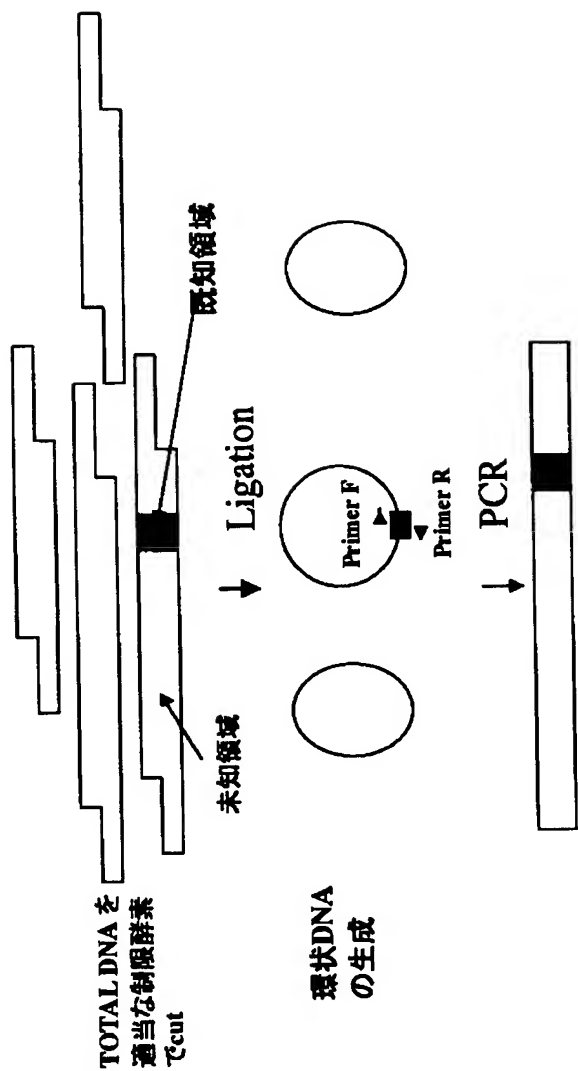
【図 2】



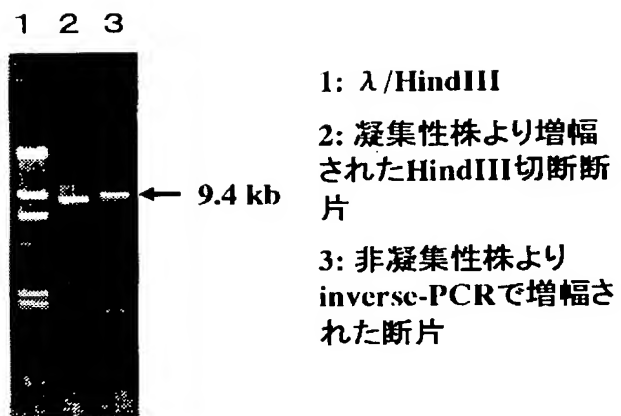
【図 3】



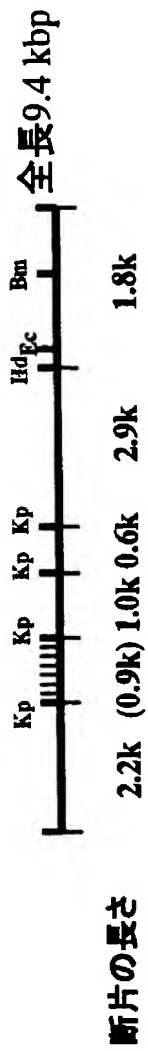
【図 4】



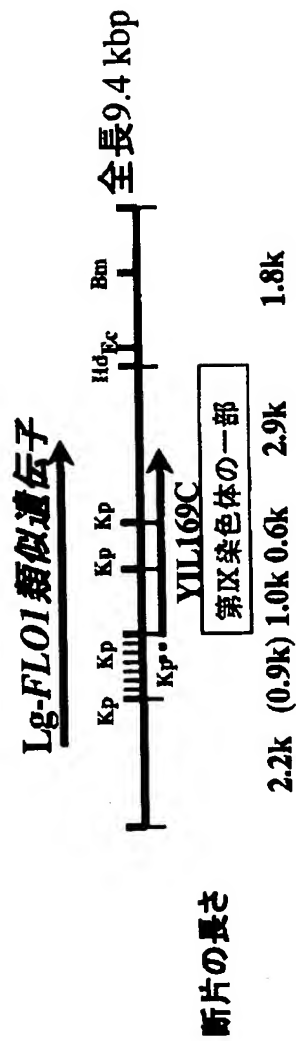
【図 5】



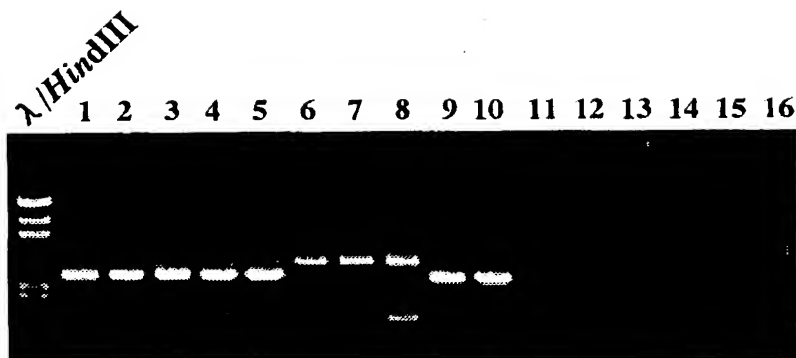
【図 6】



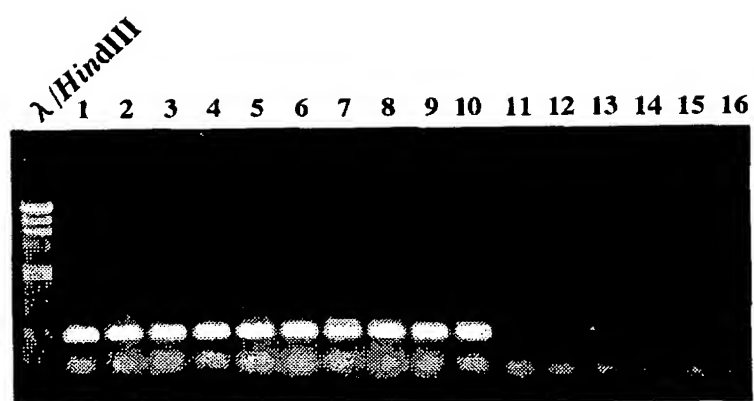
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 醸造用下面ビール酵母と野生酵母を高精度に識別する方法を提供すること。

【解決手段】 ビール酵母の識別方法であって、酵母 *Lg-FL01* 遺伝子の *N* 末端側の一部からなる塩基配列 (A) の下流に酵母第 *IX* 染色体の一部からなる塩基配列 (B) が連結し、且つ、配列表の配列番号 1 ～ 6 に記載の塩基配列を含む新規遺伝子 (C) において、前記塩基配列 (A) と前記塩基配列 (B) との連結部分を増幅可能なプライマーを合成する第 1 の工程と、前記第 1 の工程で合成したプライマー及び被検体となる酵母から分離した DNA を用いて PCR (Polymerase chain reaction) 法を行う第 2 の工程と、前記第 2 の工程で得られた PCR 増幅産物から該酵母が醸造用下面ビール酵母か野生酵母かを識別する第 3 の工程と、を含むことを特徴とするビール酵母の識別方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002196]

1. 変更年月日	1994年12月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都渋谷区恵比寿四丁目20番1号
氏 名	サッポロビール株式会社